

УДК 619:616-07

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОМА ВИРУСА ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Брендюк Е.А., 5 курс факультета ветеринарной медицины
Научный руководитель: к.б.н. Сальников Н.И.
ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Ключевые слова: вирусные инфекции, мелкие жвачные, тест-система.

Работа посвящена разработке тест-системы, выявляющей продукцию, зараженную вирусом чумы мелких жвачных.

Чума мелких жвачных (ЧМЖ) - особо опасная вирусная инфекция домашних и диких мелких жвачных, особенно подвержены ей козы и овцы. Заболевание характеризуют такие явления как лихорадка, конъюнктивиты, развитие пневмонии, язвы на слизистых оболочках ротовой и носовой полости, поражения лимфоидной системы, некротический стоматит, тяжелые формы диареи [1, 5, 7]. Все это приводит к падежу скота в течение 5-10 дней. Источником же болезни являются как больные, так и инфицированные животные, находящиеся в инкубационном периоде болезни, – со всеми экскрементами и секретами во внешнюю среду выделяется вирус. Наиболее вероятный путь заражения – аэрогенный, но возможны контактный и алиментарный пути заражения. Несмотря на малую устойчивость вируса во внешней среде, эпизоотии ЧМЖ могут развиваться в абсолютно любое время года – из-за способности к контактной передаче вирус циркулирует в животных от одного к другому.

Экономический ущерб, причиняемый чумой мелких жвачных, чрезвычайно велик. Смертность в первичных очагах может достигать 100%, а на стационарно неблагополучных территориях – до 50%. Вследствие высокой контагиозности заболевания МЭБ в первичных очагах предписывает производить стемпинг-аут. Кроме затрат на карантинные мероприятия убытки также складываются из гибели животных и снижения продуктивности (удоев молока, качества и привеса мяса, потерь шерсти и пуха) [7].

Наибольшее географическое распространение ЧМЖ получила на африканском континенте и в странах Ближнего Востока и Азии. В Российской Федерации ЧМЖ не регистрировалась и по данным Минсельхоза относится к особо опасным экзотическим заболеваниям с высоким риском заноса на территорию нашей страны [2]. Несмотря на многочисленные научно-прикладные исследования, проведенные во многих странах мира, многие аспекты эпизоотологии, мер профилактики и борьбы с этим заболеванием остаются неясными [4], поэтому возникла потребность в тест-системе, которая бы быстро распознала геном вируса ЧМЖ в зараженной продукции. Исходя из этого, целью нашего исследования стала разработка и усовершенствование

методики выявления геномной РНК вируса чумы мелких жвачных с помощью ОТ-ПЦР в режиме «реального времени».

На первом этапе работ провели анализ доступных в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей геномов различных штаммов вируса чумы мелких жвачных. В качестве мишени для отжига праймеров была выбрана нуклеотидная последовательность гена нуклеокапсидного белка (N). Для проведения реакции обратной транскрипции и амплификации выбранного участка генома рассчитана пара праймеров при использовании консенсусной последовательности гена N вируса чумы мелких жвачных. Первый праймер (PPRf) соответствует позициям 483-508 (5'-AGAGTTCAATATGTTTRTTAGCCTCCAT-3'), обратный праймер (PPRr) расположен в позициях 624-603 (5'-TTCCCCARTCACTCTCTTGT-3'). Для детекции продуктов амплификации в режиме реального времени подобран зонд технологии Taq-man, содержащий на 5'-конце излучатель флуоресценции FAM, а на 3'-конце – гаситель BHQ₁. Зонд (PPRz) находится в позициях 551-576 (FAM-5'-CACCGGAYACKGCAGCTGACTCAGAA-3'-BHQ₁). С. Batten, А. Banyard и др. проводили эксперимент, используя одношаговую ОТ-ПЦР, это требует меньших затрат времени и реагентов, но снижает чувствительность тест-системы. Дальнейшие эксперименты мы проводили, используя ОТ-ПЦР с отдельной стадией обратной транскрипции. Оптимизацию условий постановки ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием препаратов РНК, выделенных из культурального вирусосодержащего материала, инфицированного вирусом ЧМЖ. На этапе оптимизации по количеству праймеров ставилась ОТ-ПЦР с отдельной стадией обратной транскрипции с тремя вариантами реакционной смеси, разница состава заключалась в количестве праймеров и воды соответственно:

- 1,5 мкл праймеров – 8,2 мкл H₂O
- 1 мкл праймеров – 9,2 мкл H₂O
- 2 мкл праймеров – 7,2 мкл H₂O

Результаты эксперимента показали, что ОТ-ПЦР с отдельной стадией обратной транскрипции проходила лучше при варианте 1, где в пробирки добавлялось по 1,5 мкл праймеров. На этапе оптимизации по количеству dNTP ОТ-ПЦР проводилась с тремя вариантами реакционной смеси (в качестве вирусной составляющей использовалась культура клеток ПС, 1 пас. из Таджикистана), различающейся количеством dNTP и воды соответственно:

- 0,3 мкл dNTP – 14 мкл H₂O
- 0,6 мкл dNTP – 13,7 мкл H₂O
- 0,9 мкл dNTP – 13,4 мкл H₂O

По результатам эксперимента было установлено, что реакция проходит лучше в тех пробирках, где использовалась смесь, содержащая 0,3 мкл dNTP и 14 мкл H₂O соответственно.

Специфичность тест-системы оценивали путем исследования препаратов РНК вирусов болезни ЧКРС, ЧМЖ, блютанга, а также препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из крови интактных овец и коз. Положительные результаты были получены только для препаратов РНК вируса ЧМЖ, что

свидетельствует о специфичности разработанной тест – системы. Аналитическую чувствительность ПЦР определяли, исследуя препараты РНК, выделенные из последовательных десятикратных разведений культурального материала, содержащего вирус ЧМЖ с титром инфекционной активности $5 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ (Табл.1). Пределом чувствительности считали максимальное разведение, при котором регистрировали положительный результат. Рассчитанное значение аналитической чувствительности метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени составило $2,3 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$.

Таблица 1 - Результаты исследования разведений материала, инфицированного вирусом ЧМЖ (n=10)

№№ проб	Вид исследуемого материала	Титр вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$	Результат ОТ-ПЦР	Сt
1	Вирус ЧМЖ шт. «45G35»	$5,0 \pm 0,2$	+	20,32
2	-//-/-	$4,0 \pm 0,2$	+	26,25
3	Вирус ЧМЖ шт. «Эпизоотический»	$3,3 \pm 0,2$	+	25,21
4	-//-/-	$2,3 \pm 0,2$	+	28,91
5	-//-/-	$1,3 \pm 0,2$	-	

Таким образом, нами была разработана специфичная тест-система, позволяющая проводить дифференциальную диагностику в отношении чумы крупного рогатого скота и блятанга с высокой аналитической чувствительностью. Тест-система позволяет выявлять геном вируса ЧМЖ в пробах крови и органов от инфицированных животных, а также в инфицированных культурах клеток.

Библиографический список

1. Капускин, Е.В. Качественный анализ риска заноса чумы мелких жвачных на территории России / Е.В. Капускин // Ветеринарная патология. - 2007. - №4. С.18-24.
2. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин.- М., 1990. - 352 с.
3. Шоназар, Д.М. Эпизоотология чумы мелких жвачных животных в Таджикистане: автореф. дис. ... канд. вет. наук / Шоназар Джилваи Муносиб. – Душанбе, 2012. – 22 с.
4. Appel, M.J.G. Morbillivirus disease of animals and man / M.J.G. Appel [et al.] // Vertebrate animal and related viruses part B-RNA viruses. Academic press. Comparative diagnosis of viral diseases. - 1981. -Vol. 4. -P. 235-297.
5. Batten, C. A real time RT-PCR assay for the specific detection of Peste des petits ruminants virus / C. Batten [et al.] // J. of Virol. Met. – 2011.- Vol.171. -P.401-404
6. Dardiri, A.H. Peste des petits ruminants / A.H. Dardiri // Reference manual. Foreign animal disease courses. -1978. - P. 92-102.
7. Электронный ресурс <http://www.oie.int>

IDENTIFICATION OF GENOME PPRV USING POLYMERASE CHAIN REACTION

Brendyuk E.A., Salnikov N.I.

Key words: virus infection, small ruminants, genome, test system.

Work is devoted to the development of a test system that detects products infected with peste des petits ruminants.